

DAYA REDUKSI MERKURI ISOLAT BAKTERI YANG DIISOLASI DARI URINE PASIEN DI PUSKESMAS BAHU MANADO

Fatimawali¹

Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT Manado, 95115

ABSTRACT

The aim of this research was to analyze mercury reduction power from patient urine with teeth amalgam which used for mercury detoxification. The research was descriptive which isolate 5 samples of patient urine from Bahu PUSKESMAS. Bacteria were grow in a media wich consist of 5, 10, 20, 40 and 60 ppm of HgCl₂. Bacteria which grow in the highest concentration of mercury were identified and tested it reduction power against HgCl₂.

The result shows that there were 3 isolates which bacteria can grow with HgCl₂ 60 ppm namely Isolate U1.3, U3.1, and U3.3. Identification result found that isolate U1.3 and U3.1 were positive gram bacteria, rod, and motil, although U3.3 was negative gram bacteria, rod and not motil. Result of mercury reduction shows that in 24 hours, the three isolates reduce 100% mercury in nutrient broth, it concluded that isolates were highly resistant mercury bacteria. It can be used to detoxify mercury.

Key words : mercury reduction, urine, PUSKESMAS

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis daya reduksi merkuri dari urine pasien dengan tumpatan amalgam gigi yang dapat digunakan untuk detoksifikasi merkuri. Penelitian ini bersifat deskriptif, dimana bakteri diisolasi dari 5 sampel urine pasien yang berobat di poli gigi Puskesmas Bahu, yang mengalami tumpatan amalgam gigi. Bakteri ditumbuhkan dalam media yang mengandung 5, 10, 20, 40 dan 60 ppm HgCl₂. Bakteri yang tumbuh pada konsentrasi HgCl₂ paling tinggi, dilakukan identifikasi mikrobiologi, dan diuji daya reduksinya terhadap merkuri HgCl₂.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa, terdapat 3 isolat bakteri dapat tumbuh dalam media nutrient broth dengan kadar HgCl₂ 60 ppm yaitu Isolat U1.3, U3.1, dan U3.3. Hasil identifikasi mikrobiologi dari ketiga isolat ini, diperoleh bahwa isolat U1.3 dan U3.1 adalah bakteri Gram positif, berbentuk batang, dan motil, sedangkan U3.3 adalah bakteri Gram negative, berbentuk batang dan tidak motil. Hasil uji daya reduksi terhadap merkuri HgCl₂, menunjukkan bahwa dalam waktu 24 jam, ketiga isolat dapat menurunkan 100% kadar merkuri dalam media nutrient broth, dengan demikian ketiga isolat bakteri yang diperoleh merupakan bakteri resisten merkuri yang sangat tinggi, sehingga dapat digunakan dalam penelitian selanjutnya dalam proses detoksifikasi merkuri..

Kata kunci : reduksi merkuri, urin, PUSKESMAS

PENDAHULUAN

Sumber utama merkuri pada kebanyakan orang adalah tambalan gigi amalgam, khususnya amalgam yang tercampur dalam air liur. Kebanyakan merkuri dalam air liur adalah organik, sejak bakteri mulut dan organisme lainnya dalam tubuh mengubah metil merkuri anorganik menjadi bentuk merkuri organik. Merkuri dari amalgam mengandung metil yang disebabkan oleh bakteri dan *Candida albicans* yang terdapat di dalam mulut dan usus. Sekali saja uap merkuri (metil merkuri) dikonversikan menjadi merkuri anorganik dalam sel atau otak, maka merkuri tidak akan bisa keluar dari membran sel atau blood-brain barrier. Merkuri adalah logam non radioaktif yang paling beracun yang ada di lingkungan. Sangat beracun bagi manusia dan dalam jumlah berapa pun berbahaya bagi sel dan jaringan tubuh manusia. Sifat merkuri yang sangat toksik ini, membuat banyak peneliti yang melakukan penelitian tentang detoksifikasi merkuri. Salah satu usaha untuk detoksifikasi merkuri dapat dilakukan dengan menggunakan mikroorganisme resisten merkuri, misalnya bakteri resisten merkuri. Detoksifikasi merkuri oleh bakteri resisten merkuri terjadi karena bakteri resisten merkuri memiliki gen resisten merkuri, merOperon (Silver and Phung, 1998). Struktur merOperon berbeda untuk setiap jenis bakteri. Umumnya struktur merOperon terdiri dari gen metaloregulator (merR), gen transfer merkuri (merT, merP, merC), gen merkuri reduktase (merA) dan organomercuri liase (merB). Bakteri yang hanya memiliki gen merkuri reduktase (merA) disebut bakteri resisten merkuri spectrum sempit. Ada beberapa bakteri yang memiliki selain gen merA, juga gen merB maka bakteri tersebut disebut bakteri resisten merkuri spectrum luas. MerA mempunyai fungsi mereduksi ion merkuri yang toksik menjadi logam merkuri $Hg(O)$ yang kurang toksik dan mudah menguap pada suhu kamar, sedangkan merB mempunyai

fungsi mengkatalisis pemutusan ikatan merkuri-karbon sehingga dihasilkan senyawa organik dan ion $Hg(II)$ (Barkay T, 2003).

Penumpatan atau penambalan gigi merupakan salah satu cara untuk mempertahankan gigi karies agar tidak dicabut. Berbagai macam bahan tumpatan dikenal dalam kedokteran gigi, misalnya : amalgam, akrilik resin nirpasi, komposit berbasis resin, seng fosfat. Sampai saat ini amalgam merupakan bahan tumpatan yang paling banyak dikembangkan dan diuji dibandingkan bahan tumpatan lain, karena awet, mudah digunakan, tidak mudah pecah dan relatif murah. Merkuri yang merupakan kandungan utama amalgam merupakan logam berat alamiah yang bisa berdampak buruk bagi kesehatan manusia. Keracunan merkuri dapat menyebabkan kerusakan sistem saraf pusat, kerusakan ginjal, kerusakan paru-paru, pada janin dapat menimbulkan cacat mental, buta, dan serebral palsy, dan bisa meningkatkan angka kematian (Pamuryanto R, 2007).

Diketahui bahwa bakteri yang resisten terhadap merkuri mempunyai kemampuan untuk menurunkan toksisitas atau detoksifikasi merkuri melalui mekanisme enzimatik. Bakteri ini mampu untuk mereduksi ion Hg^{2+} menjadi Hg^0 oleh enzim merkuri reduktase (Silver and Phung, 2005). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan mencari gambaran bakteri pereduksi merkuri pada pasien tumpatan amalgam untuk diteliti lebih lanjut potensinya demi menghindari efek-efek paparan merkuri pada tubuh manusia.

METODOLOGI PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 3 bulan yaitu pada bulan Agustus 2012 sampai Oktober 2012, yang dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi FMIPA UNSRAT Manado.

Alat dan Bahan Penelitian

Alat –alat yang digunakan pada penelitian meliputi pH meter, termometer, autoklaf,

inkubator, cawan petri, tabung reaksi, jarum ose, erlenmeyer, gelas ukur, *beker glass*, spatula, timbangan analitik, pipet ukur, pipet tetes, kaca slide/objek, mikroskop, lampu spiritus, tabung durham, tabung hush, aluminium foil, plastik wrap, mikropipet, tabung ependorf, sarung tangan dan hotplate.

Bahan yang digunakan yaitu limbah pertambangan (Tanah) dan bahan kimia yang digunakan seperti aquades, alkohol, *nutrient agar*, *nutrient broth*, NaCl, *yeast ekstrak*, peptone, safranin, kristal violet, kaldu karbohidrat/*fenol red* (maltosa, glukosa, laktosa), *motility test medium*, *simon citrate agar*, *Triple Sugar Iron (TSI) agar*, MT-3 agar.

Pengambilan Sampel dan Uji resistensi Merkuri dari Bakteri

Sampling dilakukan dengan mengambil urine dengan volume 0,5-1 ml pada pasien poli gigi dengan tumbatan amalgam dengan bantuan *disposable injection* (tanpa jarum suntik).

Urine disuspensikan ke dalam buffer saline 0,9%. Sebanyak 100 µL larutan jernih sampel yang telah disuspensi dalam buffer salin diinokulasi pada media *nutrient broth* (*yeast extract* 2 g/L, *bacto pepton* 5 g/L, NaCl 5 g/L) yang mengandung 0, 10, 20, 40 dan 60 mg/l HgCl₂ dan diinkubasi pada temperatur 37 °C selama 24 jam.

Identifikasi Mikrobiologi

Media yang mengandung HgCl₂ paling tinggi yang dapat ditumbuhi bakteri resisten merkuri, dilakukan isolasi bakteri dan ditumbuhkan pada media *nutrient agar*. Selanjutnya dilakukan identifikasi terhadap pewarnaan Gram, morfologi (bentuk) dan motilitas.

Uji Daya Reduksi Merkuri dari Bakteri Resistan Merkuri

Diambil 1 *Öse* Bakteri resisten merkuri tinggi dari media agar padat.

Ditanam dalam media *nutrient broth* yang mengandung 50 mg/l HgCl₂. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam, 12 jam dan 24 jam. Pada akhir inkubasi, ditambahkan H₂SO₄ pekat 2 tetes untuk membunuh bakteri untuk selanjutnya dianalisis kadar merkuri dengan metode analisis CVAAS dan dilakukan analisis blanko.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Resistan Merkuri dari Bakteri

Hasil pemeriksaan resistensi merkuri HgCl₂ bakteri yang diperoleh dari 5 sampel urine ditampilkan pada Tabel 1. Sebanyak 20 isolat yang berasal dari 5 sampel urine tumbuh pada media NB dengan konsentrasi HgCl₂ 10 mg/l, 17 isolat yang tumbuh pada konsentrasi HgCl₂ 20 mg/l dan 15 isolat yang tumbuh pada konsentrasi HgCl₂ 40 mg/l, serta 3 isolat yang tumbuh pada konsentrasi HgCl₂ 60 mg/l. Bakteri yang tumbuh pada media dengan kadar HgCl₂ 5 mg/l dapat dikatakan bahwa bakteri tersebut memiliki tingkat ketahanan merkuri anorganik tinggi (Canstein *et al* dalam Risa Nofiani dan Gusrizal, 2004). Terdapat perbedaan tingkat resistensi dari ke 20 isolat bakteri. Perbedaan resistensi ini berhubungan dengan mekanisme respon terhadap merkuri.

Secara umum, respon terhadap kondisi stress oleh bakteri dapat melalui beberapa variasi mekanisme, seperti : (1) Penghambatan metabolisme seluler sehingga pertumbuhan sel terhambat atau mati. (2) Induksi kerja operon resistensi merkuri sehingga sel tetap hidup dalam kondisi stress. (3) Terbentuknya plasmid dengan gen resistensi merkuri. Bakteri yang hanya dapat hidup pada media dengan HgCl₂ 5 mg/l, kemungkinan memiliki respon dengan menghambat metabolisme seluler sehingga sel bakteri mati, sedangkan yang dapat hidup pada konsentrasi HgCl₂ 10 mg/l atau lebih besar, diduga mengandung gen resistensi merkuri (Smit *et al.*, 1998).

Tabel 1. Hasil pengujian pertumbuhan bakteri pada media Nutrien Broth (NB) yang mengandung merkuri anorganik (HgCl_2)

No.	Kadar HgCl_2 dalam NB (mg/l)	Jumlah kultur yang tumbuh
1.	10	20
2	20	17
3	40	15
4	60	3

Ketiga isolat yang tumbuh pada media nutrient broth dengan kadar merkuri tertinggi yaitu 60 mg/l, adalah U1.3, U3.1 dan U3.3. Ketiga isolat ini kemungkinan mempunyai gen resistensi merkuri anorganik (gen resistensi merkuri spectrum sempit. Terhadap ketiga isolat bakteri resisten merkuri yang diperoleh ini, dilakukan penelitian selanjutnya untuk mengetahui genus atau jenis bakteri resisten merkuri dan kemampuannya dalam mereduksi merkuri anorganik HgCl_2 .

Identifikasi Bakteri secara Mikrobiologi

Terhadap ketiga isolat yang resisten merkuri paling tinggi dilakukan identifikasi mikrobiologi.

Uji Pewarnaan Gram dan Bentuk Bakteri

Dalam uji pewarnaan Gram dapat diketahui struktur dinding sel. Adanya perbedaan struktur luar dinding sel bakteri gram positif dan gram negatif mengakibatkan adanya perbedaan warna antara keduanya pada akhir prosedur pewarnaan gram. Bakteri gram positif akan memberikan respon warna ungu atau *violet* (kadang-kadang kehitaman). Bakteri ini memiliki dinding sel yang terdiri dari peptidoglikan tebal tanpa lapisan protein dan lipopolisakarida. Dari hasil penelitian didapatkan 2 isolat merupakan bakteri Gram positif dan berbentuk batang yaitu U1.3 dan U3.1. Bakteri Gram negatif akan memberikan respon warna merah atau merah muda. Bakteri ini memiliki lapisan peptidoglikan yang tipis dan mudah pecah

dan dilapisi oleh protein dan lipopolisakarida pada bagian luar. Hasil penelitian menunjukkan 1 isolat bakteri merupakan bakteri gram negatif, bentuk batang, yaitu isolat U3.3. Hasil pewarnaan Gram ini dapat dilihat pada Tabel 2. Bakteri Gram-positif berwarna ungu disebabkan kompleks zat berwarna kristal violet yodium tetap terikat pada dinding sel bakteri meskipun diberi larutan pemucat, sedangkan bakteri gram-negatif berwarna merah karena kompleks tersebut larut sewaktu pemberian larutan pemucat dan kemudian menyerap zat warna kedua (safranin) yang berwarna merah. Perbedaan hasil pewarnaan ini disebabkan perbedaan struktur dinding sel kedua kelompok bakteri tersebut. Perbedaan struktur dinding sel bakteri gram-positif dan gram-negatif menyebabkan perbedaan reaksi dalam permeabilitas zat warna dan penambahan larutan pemucat. Sebagian besar dinding sel bakteri gram-negatif memiliki kandungan lipida yang tinggi dibandingkan dengan sel bakteri gram-positif. Lipida ini akan larut dalam alkohol yang digunakan sebagai larutan pemucat, sehingga pori-pori dinding sel membesar dan meningkatkan daya larut kompleks violet iodium pada dinding sel bakteri gram-negatif. Pengujian ini bertujuan untuk menentukan karakteristik mikroskop setiap galur bakteri uji.

Uji Motilitas

Uji motilitas dilakukan pada media semisolid. Hasil pengujian bakteri ini bervariasi, ada yang motil dan non motil. Dikatakan motil atau uji motilitas positif,

maka akan terbentuk perbendaran atau pelebaran pertumbuhan di sekitar tusukan. Hasil negatif jika tidak ada perbendaran atau pelebaran pertumbuhan di sekitar tusukan. Hasil uji menunjukkan dua isolat yang diperiksa menunjukkan positif adanya pergerakan bakteri (motil). Motilitas bakteri ini terlihat karena adanya pertumbuhan melebar atau penyebaran yang berwarna putih seperti akar disekitar

inokulasi. Hal ini menunjukkan adanya pergerakan dari bakteri yang diinokulasikan, yang berarti bahwa bakteri ini memiliki flagella (alat gerak) yang ada pada permukaan sel karena tidak semua bakteri memiliki struktur ini, yang berfungsi dalam pergerakan bakteri. Sedangkan satu isolat U3.3. tidak memperlihatkan adanya pergerakan.

Tabel 2. Hasil Uji Mikrobiologi Bakteri Resisten merkuri

No	Isolat	Uji Morfologi dan Fisiologi			
		Gram	Batang	Coccus	Uji Motility
1	U1.3	Positif	+	-	+
2	U3.1	Positif	+	-	+
3	U3.3	Negatif	+	-	-

Analisis Daya Reduksi Merkuri dari Bakteri Resisten Merkuri Anorganik

Menurut Vetriani *et al.*, 2004, bakteri resisten merkuri tinggi mengandung *mer* operon yang mengkode flavoenzim, merkuri reduktase yang dapat mereduksi ion Hg^{2+} menjadi Hg^0 yang kurang toksik. Pada penelitian ini telah dilakukan uji daya reduksi merkuri bakteri yang resisten merkuri tinggi yaitu isolat U1.3, U3.1 dan U3.3. Isolat ditumbuhkan dalam media nutrisi broth yang mengandung $HgCl_2$ 50 mg/l selama 1 jam, 12 jam dan 24 jam, dilakukan juga kontrol $HgCl_2$ dan media. Analisis dilakukan dengan metode analisis CV-AAS. Hasil analisis menunjukkan bahwa ketiga isolat bakteri resisten merkuri dapat menurunkan kadar Hg dalam waktu 1, 12 dan 24 jam. Hasil pengukuran konsentrasi merkuri terlihat pada Tabel 3.

Dari Tabel 3, terlihat bahwa dalam waktu 1 jam, bakteri dapat menurunkan konsentrasi merkuri dalam media yaitu isolat U1.3 :7.6%, U3.1: 12%, dan U3.3 : 21.8%. Dalam waktu 12 jam semua kultur bakteri menurunkan kadar merkuri hampir 100% dalam media, sedangkan dalam waktu 24 jam, semua isolat dapat menurunkan kadar merkuri sampai 100%. Ketiga isolat bakteri ini diduga mengandung gen *merA* yang terlibat dalam mekanisme resistensi merkuri, dimana gen *merA* yang menyandi protein yang dapat mereduksi Hg^{2+} menjadi Hg^0 . Terhadap ketiga isolat bakteri ini, dapat dilakukan isolasi DNA genom dan plasmid untuk analisis gen *merA* yang dapat digunakan untuk detoksifikasi merkuri anorganik.

Tabel 3. Analisis Konsentrasi HgCl_2 dengan CV-AAS

No.	Perlakuan	Kadar Hg (mg/l)							
		0 jam	%	1 jam	%	12 jam	%	24 jam	%
1.	Kontrol Media NB	0	0	0	0	0	0	0	0
2.	Kontrol HgCl_2	50	100	50	100	50	100	50	100
3.	Isolat U1.3	50	100	3.8	7.6	1.2	2.4	0	0
4.	Isolat U3.1	50	100	6.0	12	3.0	6.0	0	0
5.	Isolat U3.3	50	100	10.9	21.8	3.7	7.4	0	0

Penurunan konsentrasi merkuri dalam kultur yang mengandung bakteri resisten merkuri karena bakteri tersebut mempunyai enzim sitosolik flavoenzim merkuri ion reduktase yang mengkatalisis reduksi Hg^{2+} menjadi Hg^0 dengan NADPH sebagai donor elektron (Fox and Walsh, 1981 ; Zeroual *et al.*, 2003) . Hg^0 yang terbentuk tereliminasi dari sel melalui difusi pasif dibawah kondisi fisiologik yang normal, karena tingginya tekanan uap dari logam merkuri ini sehingga terjadi penguapan merkuri dari media (Chang *et al.*, 1993). Proses ini merupakan suatu detoksifikasi merkuri dimana logam merkuri yang terbentuk bersifat volatile sehingga dapat berpenetrasi keluar dari media (Barkay and Summer, 2003).

PENUTUP

Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa, terdapat 3 isolat bakteri resisten merkuri anorganik yang dapat tumbuh dalam media nutrient broth dengan kadar HgCl_2 60 ppm yaitu isolat U1.3, U3.1 dan U3.3. Hasil identifikasi mikrobiologi dari ketiga isolat ini, diperoleh bahwa isolat U1.3 dan U3.1 adalah bakteri Gram positif, berbentuk batang, dan motil. Sedangkan isolat U3.3 adalah bakteri Gram negatif, berbentuk batang, dan tidak motil. Hasil uji daya reduksi terhadap merkuri anorganik HgCl_2 , menunjukkan bahwa dalam waktu 24 jam,

ketiga isolat dapat menurunkan 100% kadar merkuri dalam media nutrient broth, dengan demikian ketiga isolat bakteri yang diperoleh merupakan bakteri resisten merkuri anorganik yang sangat tinggi, sehingga dapat digunakan dalam penelitian selanjutnya dalam proses detoksifikasi merkuri.

Saran

Bakteri resisten merkuri anorganik yang diperoleh pada penelitian ini dilakukan amplifikasi gen resistensi merkuri *merA* untuk digunakan dalam proses detoksifikasi merkuri secara enzimatik..

DAFTAR PUSTAKA

- Barkay T, Miller SM, Summers AO. 2003. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol Rev*, 27: 355-384.
- Fatimawali, Billy Kepel, Irawan Yusuf, Rosdiana Natsir, Fatmawaty, 2009, "Populasi Bakteri pada Tanah Buangan Limbah Merkuri Tambang Emas di kabupaten Bolaang Mongondow" : *Penelitian Pendahuluan*, Jurnal Kedokteran Yarsi, ISSN:0854-1159, vol.17 No.2 Mei-Agustus 2009., Univ. Yarsi, Jakarta.
- Iohara K, Iiyama R, Nakamura K, Silver S, Sakai M, Takeshita M, Furukawa K. 2001. The Mer operon of a

- mercury-resistant
Pseudoalteromonas haloplanktis
 strain isolated from Minamata Bay.
Japan Appl. Microbiol Biotechnol,
 56: 736-741.
- Kepel BJ. 2009. Isolasi dan identifikasi
 bakteri resisten merkuri pads
 sediment tanah buangan limbah
 pertambangan emas rakyat di Tatelu,
 Minahasa Utara. FK-Unsrat : Hasil
 penelitian, belum dipublikasikan.
- Liebert CA, Wireman J, Smith T,
 Summers AO. 1997. Phylogeny of
 Mercury Resistance (*mer*) Operons
 of Gram-Negative Bacteria Isolated
 from the Fecal Flora of Primates.
App Environment Microbiol, 63(3):
 1066 -1076.
- Osborn AM, Bruce KD, Strike P, Ritchie
 DA. 1997. Distribution, diversity
 and evolution of the bacterial
 mercury resistance (*mer*) operon.
FEMSMicrobiol Rev, 19: 239-262.
- Pamuryanto R. Dampak kesehatan akibat
 merkuri. Disampaikan pada
 lokakarya penutupan kampanye
 nasional: Penyadaran bahaya
 merkuri dan penggunaan teknologi
 pengolahan emas yang lebih aman,
 Kasongan, 21 februari, 2007
- Silver S, Phung LT. 2005. A bacterial
 view of the periodic table: genes and
 proteins for toxic inorganic ions. *J
 Ind Microbiol Biotechnol*, 32(11-
 12): 587-605.
- Suheryanto, Soetarto ES, Sugiharto E,
 Djohan TS. Bakteri resisten
 metilmerkuri dari sedimen sungai
 Sangon Kulonprogo DIY. Berkala
 ilmiah biologi 2008; 7(2): 43-51